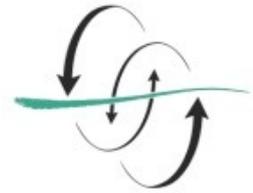


FACULTAD
DE CIENCIAS
DEL MAR



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA

BIOTOXINAS MARINAS: METODOLOGÍAS ANALÍTICAS Y ALGUNOS EVENTOS EN LA REGIÓN MACARONÉSICA

Letizia Monteiro Branco Pedro

Curso 2019/2020

Tutoras:

Sarah Montesdeoca Esponda

María Esther Torres Padrón

Trabajo de Fin de Título para la
obtención del título de Máster
en Oceanografía

Título del TFM: Biotoxinas marinas: Metodologías analíticas y algunos eventos en la región Macaronésica

Datos personales: Letizia Monteiro Branco Pedro

Máster Universitario de Oceanografía por la Universidad de Cádiz, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria y Universidad de Vigo.

Correo:

Datos de las tutoras:

Sarah Montesdeoca Esponda. Grupo de Análisis Químico Medioambiental (AQMA). Instituto Universitario de Estudios Ambientales y Recursos Naturales (IUNAT). Correo:

María Esther Torres Padrón. Grupo de Análisis Químico Medioambiental (AQMA). Instituto Universitario de Estudios Ambientales y Recursos Naturales (IUNAT). Correo:

Fecha de entrega: 17/09/2020

Alumno

AGRADECIMIENTOS

La realización de este Trabajo de Fin de Máster (TFM) solo fue posible gracias al incentivo y apoyo de profesores, familiares y amigos. Así que me gustaría dar las gracias.

Empiezo a destacar a mis tutoras, Sarah Montesdeoca y María Esther Torres, de una forma muy particular, por su disposición a llevar adelante este trabajo y por su interés incondicional en seguir el desarrollo de esta investigación, a pesar de otras ocupaciones. Agradezco del corazón el apoyo, las críticas, las sugerencias y la disponibilidad durante este período.

Quiero dejar unas palabras de agradecimiento al Gobierno de Canarias por haber concedido la solicitud de beca, sin la cual la investigación se vería comprometida.

También es saludable, dirigir un agradecimiento a mis familiares, mis amigos por el apoyo brindado. Amplío reconocimiento a todos aquellos que de una forma u otra contribuyeron al éxito de este trabajo.

CONTENIDO

ABREVIATURAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
1- INTRODUCCIÓN	9
2- TIPOS DE BIOTOXINAS Y SUS EFECTOS	12
3- METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE BIOTOXINAS EN ORGANISMOS MARINOS	19
4- EVENTOS PRODUCIDOS EN LA MACARONESIA	23
5- CONCLUSIONES	28
6- BIBLIOGRAFÍA	29

ABREVIATURAS

AO	Ácido Okadaico (Okadaic acid)
ASP	Intoxicación Amnésica por Mariscos (Amnesic Shellfish Poisoning)
AZA	Azaspiracida (Azaspiracid)
AZP	Intoxicación Azaspirácida por Mariscos (Azaspiracid Shellfish Poisoning)
CE	Comisión Europea
CFP	Intoxicación por Peces Ciguatera (Ciguatera Fish Poisoning)
DA	Ácido Domoico (Domoic Ácid)
DSP	Intoxicación Diarreica por Mariscos (Diarrhoeic Shellfish Poisoning)
DTX	Dinofisistoxina (dinophysistoxin)
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (European Food Safety Authority)
ELIKA	Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria
ELISA	Ensayo de Inmunosorbente Ligado a Enzimas (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (Food and Agriculture Organization of the United Nations)
HAB	Floración de Algas Nocivas (Harmful Algal Bloom)
MBA	Bioensayo de Ratón (Mouse Bioassay)
NSP	Intoxicación Neurotóxico por Mariscos (Neurotoxic Shellfish Poisoning)
PITX	Paliotoxina (Paliotoxin)
PSP	Envenenamiento Paralítico de Mariscos (Paralytic Shellfish Poisoning)
PTX	Pectenotoxina (Pectenotoxin)
SVEICC de Canarias	Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Intoxicación por Ciguatoxinas
STX	Saxitoxina (Saxitoxin)
TTX	Tetrodotoxina (Tetrodotoxin)
UE	Unión Europea
UR	Unidad de Ratón
YTX	Yesotoxina (Yessotoxin)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del proceso de intoxicación por biotoxinas	10
Figura 2. Mapa de la zona de estudio	12
Figura 3. Estructura química de AO y sus análogos.....	14
Figura 4. Estructura química de la Pectenotoxina	15
Figura 5. Estructura química de las azaspirácidos y sus análogos	16
Figura 6. Estructura química de las ciguatoxinas	17
Figura 7. Estructura de DA.....	18
Figura 8. Estructura de la TTX	19
Figura 9. Número de brotes de CFP en Canarias entre 2004 y 2018	27

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Grupos de toxinas y sus respectivas algas asociadas.....	13
Tabla 2. Características principales de los brotes de CFP en Macaronesia.....	24

RESUMEN

Las biotoxinas son consideradas un problema de salud pública en todo el mundo, debido a los graves efectos que pueden causar al hombre. Son sustancias tóxicas producidas principalmente por algunas especies de diatomeas y dinoflagelados, que se acumulan en los tejidos de organismos como peces o moluscos filtradores. Cuando esos productos contaminados son ingeridos por el hombre, provocan una serie de complicaciones con sintomatología muy variada que engloban trastornos digestivos, neurológicos y cardiovasculares. Además, la presencia de estas biotoxinas ocasiona graves perjuicios económicos en todas las actividades relacionadas con los productos de la pesca, desde los productores primarios hasta los procesadores industriales. Por tanto, el control de los productos marinos de consumo humano resulta de gran importancia.

En el periodo comprendido entre los años 2004 y 2018 se registraron un total de 21 brotes de ciguatera en la Macaronesia; 18 en Canarias y 3 en Madeira. En total suponen un total de 154 personas afectadas, con predominancia de los medregales como los principales peces responsables de causar la intoxicación. En Azores y Cabo Verde no se dispone de una base de datos de este tipo de eventos, por lo que esta revisión bibliográfica demuestra la necesidad de investigar y mejorar las técnicas de identificación y cuantificación de las biotoxinas en productos de origen marino, así como de monitorizar su presencia y toxicidad en la Macaronesia.

Este Trabajo Fin de Máster presenta una revisión bibliográfica acerca de las biotoxinas marinas más importantes en productos de consumo, así como de los métodos más utilizados para su determinación en productos de consumo. Además, se han recopilado los eventos de intoxicaciones que han sido documentados en la Macaronesia. Según la literatura consultada, los métodos más fiables para detección de biotoxinas en dicha región son los test desarrollados para toxinas específicas (ciguatoxinas) y la cromatografía líquida con espectrometría de masas.

Palabras clave: Biotoxinas; Métodos de determinación; Eventos de intoxicación, Macaronesia

ABSTRACT

Biotoxins are considered a public health problem worldwide due to the serious effects that could cause human damage. They are toxic substances produced mainly by diatoms and dinoflagellates, which accumulate in the tissues of fish and filter-feeding molluscs. When these polluted products are ingested by humans, they cause several complications with very varied symptoms that include digestive, neurological and cardiovascular disorders. Moreover, the occurrence of these biotoxins causes serious economic losses in all activities related to fishery products, from the primary producers to the industrial processors. Therefore, the control of marine products for human consumption is of great importance.

In the period between 2004 and 2018 a total of 21 events of ciguatera in Macaronesia have been registered; 18 in Canary Islands and 3 in Madeira. In total, they affected 154 persons, with predominance of “medregal” as the main fish responsible for causing intoxication. In Azores and Cape Verde there is no data base for this type of events, so this bibliographic review addresses the need to investigate and improve the techniques of identification and the quantification of biotoxins in products of marine origin, as well as to monitor its presence and toxicity in Macaronesia.

This Final Master Degree Work presents a bibliographic review about the most important marine biotoxins that has been carried out, as well as the most used methods for their determination in consumer products. In addition, the intoxication events documented in Macaronesia have been compiled. According to the literature consulted, the most reliable methods for detecting biotoxins in this region are tests developed for specific toxins (ciguatoxins) and liquid chromatography with mass spectrometry.

Keywords: Biotoxins; Determination methods; poisoning events; Macaronesia

1- INTRODUCCIÓN

La aparición de biotoxinas marinas en zonas geográficas donde no se había informado de ellas con anterioridad es una preocupación de considerable impacto en la contaminación de los productos del mar y, por consiguiente, en la salud (FAO, 2005). Aunque el cambio climático y el aumento de la disponibilidad de nutrientes se han considerado como algunos de los factores clave de la presencia de estas toxinas en nuevas áreas, por lo que ha aumentado el interés científico por este tipo de contaminación natural, bien en el estudio de eventos de mayor intensidad biológica de las invasiones y/o la disponibilidad de métodos analíticos más sensibles y sencillos que permitan su determinación (Gerssen & Gago-Martínez, 2019).

El término “biotoxinas” hace referencia a sustancias naturales producidas por algas microscópicas, que se encuentran distribuidas en todas las aguas del planeta y que pueden crecer a un ritmo muy acelerado, en ocasiones acompañados de coloraciones del agua denominadas, comúnmente, mareas rojas (Botana, et al., 2018). Este fenómeno llamado floración de algas nocivas (HAB, *harmful algal bloom*) es un problema mundial y ha ido aumentando drásticamente en las últimas décadas (FAO, 2005).

La producción de estas biotoxinas puede tener como función luchar por espacios o combatir la predación (FAO, 2005) e incluyen una amplia gama de sustancias con diversos mecanismos de acción, estructura molecular y actividad biológica.

Así, entre los factores que favorecen su aparición, están la utilización de las aguas costeras en acuicultura, la reproducción acelerada de las especies de fitoplancton, la transferencia de mariscos de una zona a otra, la mayor movilidad de las sustancias húmicas y metales traída desde el suelo por deforestación y/o precipitaciones ácidas (lluvia ácida) y las condiciones climáticas poco comunes (FAO, 2005).

Con el paso del tiempo, estas sustancias se acumulan en los organismos que se han alimentado de las algas que las producen, teniendo efectos negativos tanto biológicos como ecológicos para el ambiente marino (Farabegoli et al., 2018), pudiendo acumularse en peces y moluscos que se alimentan por filtración y originando intoxicaciones agudas a consecuencia del consumo de esos organismos (Roman, R & Acebey, 2014). La ingestión de organismos marinos intoxicados puede generar problemas de salud graves a los humanos (Rodríguez et al., 2018).

La exposición por parte de los humanos se produce, mayoritariamente, a través del consumo de moluscos bivalvos, que son grandes filtradores, concentrando mucha cantidad de toxinas por su forma de alimentación (Alfonso Méndez, 2008). En este grupo destacan los mejillones (*Mytilus chilensis*), vieiras (*Pecten maximus*), almejas (p.e. *Protothaca taca*), berberechos (*Cardium edule*) (berberechos) y ostras (*Ostrea edulis*), que son conocidos como principales vectores de transmisión. Además, algunas especies de gasterópodos como *Phorcus lineatus*, carnívoros y excavadores también pueden ser transmisores de toxinas (Suárez-Gómez, 2003), como se muestra en la Figura 1. Otra forma de intoxicarse con estas sustancias es mediante el contacto con la piel o por su inhalación en forma de aerosol (Morabito et al., 2018).

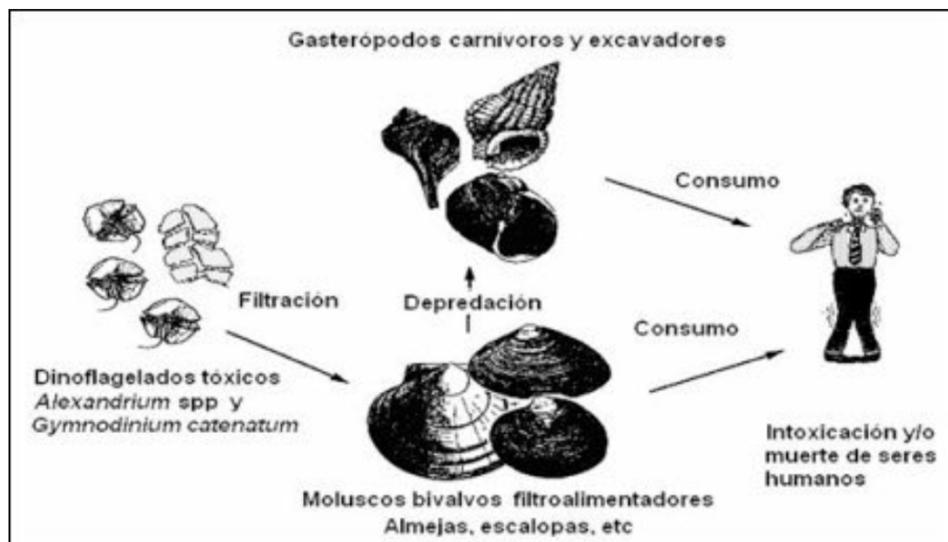


Figura 1. Esquema del proceso de intoxicación por biotoxinas

(Fuente: Mózo, 2017)

En el océano existen dos clases de algas unicelulares productoras de biotoxinas: los dinoflagelados, que son los mayores productores de toxinas y con capacidad de acumulación en la cadena alimenticias, y las diatomeas (Botana et al., 2018). De las 2000 especies de dinoflagelados conocidas, cerca de 300 son responsables de esta alta proliferación, que generan la coloración del agua y que, dependiendo de la especie, pueden originar mareas no solo rojas sino también incoloras, pardas, verdes o azules (Suárez-Gómez, 2003).

Algunas especies de dinoflagelados y diatomeas responsables de la coloración del agua y de la muerte de peces y otros organismos marinos son *Noctiluca scintillans* y *Skeletonema*

costatum, y algunos pertenecientes a los géneros *Alexandrium*, *Gymnodinium*, *Dinophysis* y *Pseudo-nitzschia* (Visciano et al., 2016). La especie *Alexandrium catenella* tiene la capacidad de producir altas concentraciones de saxitoxinas, que bloquean los impulsos nerviosos, causan parálisis en los intoxicados y pueden ser letales, mientras que la especie *Dinophysis acuta* produce toxinas que, a bajas concentraciones, modifican la permeabilidad del tracto digestivo llevando a problemas gastrointestinales resultando en diarreas (Suárez & Guzmán, 2005).

Con el aumento de la floración de algas nocivas y como consecuencias de fenómenos de intoxicaciones en humanos, es de gran importancia tomar medidas, realizando monitoreos para verificar la ausencia de toxinas en productos de consumo e informando sobre riesgos de exposición humana a través de estudios epidemiológicos, así como creando estrategias para evitar su ocurrencia, es decir, apoyar el intercambio de informaciones científicas en un tema tan importante para la seguridad alimentaria a nivel mundial y que presenta una amenaza para la salud humana. También hay que destacar que la presencia de biotoxinas marinas causa enormes pérdidas económicas al sector, siendo además las microalgas una fuente de productos de interés terapéutico y farmacológico (Soliño, 2015).

Las metodologías actuales deben ser capaces de determinar si los productos marinos cumplen con la legislación y son adecuados para el consumo humano. Teniendo en cuenta todo lo anterior, este trabajo tiene como objetivo describir las principales biotoxinas marinas y los procedimientos analíticos utilizados para su identificación. Posteriormente, se revisarán los eventos registrados en la Macaronesia (Figura 2) porque en la última década se han venido sucediendo con frecuencia fenómenos de intoxicación alimentaria causadas por biotoxinas marinas en esta zona, con más incidencia en las Islas Canarias y Madeira (Boente-Juncal et al., 2019). Los estudios para determinar estas toxinas en la cadena trófica podrían ser de gran relevancia.



Figura 2. Mapa de la zona de estudio (Realizada con: Ocean Data View)

2- TIPOS DE BIOTOXINAS Y SUS EFECTOS

Desde el punto de vista químico, las toxinas marinas presentan como características peculiares la complejidad de sus estructuras, conteniendo varios enlaces poliéster y de síntesis química difícil, y la gran variedad de mecanismos de acción presentando intoxicaciones a bajas concentraciones, $\mu\text{g/ml}$ (Botana et al., 2018).

En función del tipo de toxina, se dan diferentes tipos de intoxicación en humanos intoxicación diarreica por consumo de molusco (DSP, diarrhetic shellfish poisoning), intoxicación amnésica por consumo de molusco (ASP, amnesic shellfish poisoning), intoxicación neurotóxica por consumo de molusco (NSP, neurotoxic shellfish poisoning) e intoxicación ciguatérica por consumo de pescado (CFP, ciguatera fish poisoning) (FAO, 2005). Muchas de esas toxinas difieren en sus estructuras, solubilidad y en su modo de acción. De estas, DSP, ASP y NSP son causadas principalmente por el consumo de mariscos contaminados, mientras que CFP es causada por el consumo de peces que han acumulado la toxina ciguatera durante la cadena alimentaria (FAO, 2005).

Con el aumento de nuevas toxinas también existe la necesidad de clasificarlas según sus estructuras químicas, clasificándose en los siguientes grupos: grupo del ácido domoico (DA), del ácido okadaico (AO) -incluyendo las dinofisistoxinas (DTXs)-, azaspirácidos (AZAs), brevetoxinas (BTXs), ciguatoxinas (CTXs), iminas cíclicas (CIs), maitotoxinas (MTXs), palitoxinas (PITXs), pectenotoxinas (PTXs), saxitoxinas (STXs) y yesotoxinas (YTXs) (Botana et al., 2018; Morabito et al., 2018). A su vez, las diferentes toxinas están asociadas a un tipo de alga distinta, como se puede observar en la Tabla 1.

Tabla 1. Grupos de toxinas y sus respectivas algas asociadas (Fuente: FAO, 2011)

Grupo de toxinas	Abreviatura	Asociado a algas
Azaspirácido	AZA	<i>Azadinium spinosum</i>
Brevetoxina-b	BTX	<i>Karenia brevis</i>
Ácido domóico	DA	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.
Gymnodimina	GYM	<i>Karenia selliformis</i>
Ácido okadaico	AO	<i>Dinophysis</i> spp. <i>Prorocentrum</i> spp.
Palitoxina	PLTX	<i>Ostreopsis</i> spp.
Pectenotoxinas-s	PTX	<i>Dinophysis</i> spp.
Prorocentrolide	PCL	<i>Prorocentrum</i> spp.
Saxitoxina	STX	<i>Alexandrium</i> spp., <i>G. catenatum</i> , <i>P. bahamense</i>
13-DM espirólido C	SPX	<i>Alexandrium ostenfeldii</i>
Yesotoxina	YTX	<i>P. reticulatum</i> , <i>L. polyedrum</i> , <i>G. spinifera</i>

En lo que se refiere al grado de solubilidad en soluciones orgánicas, las toxinas se agrupan en anfifílicas, lipofílicas e hidrofílicas (Hess, 2010). A continuación, se describen las biotoxinas lipofílicas e hidrofílicas más importantes.

Toxinas Lipofílicas

Entre las toxinas lipofílicas están el grupo del ácido okadaico (AO), el grupo de pectenotoxinas (PTX), el grupo de azaspirácidos (AZAs) y las ciguatoxinas (CTXs). Antiguamente, todos los grupos se encontraban dentro del grupo de AO, pero con el pasar del tiempo se descubrió que estos grupos están formados por distintas toxinas desde el punto de vista químico y toxicológico y fueron clasificadas por separado (García Mansilla, 2016).

Grupo de ácido okadaico (OA)

Este grupo está constituido por las toxinas procedentes del AO y sus análogos, las dinofisistoxina-1 (DTX-1) y dinofisistoxina-2 (DTX-2), que son producidas por dinoflagelados pertenecientes a especies del género *Dinophysis spp.* y *Prorocentrum spp.*, tales como *Dinophysis acuminata*, *Dinophysis acuta*, *Dinophysis caudata*, *Dinophysis fortii*, *Dinophysis miles*, *Dinophysis ovum*, *Dinophysis sacculus*, *Dinophysis rotundata*, *Dinophysis tripos* y *Prorocentrum lima* (Manfrin et al., 2010).

En lo que se refiere a la estructura del AO y las DTXs, todos ellos son compuestos polietéreos liposolubles. La Figura 3 muestra la estructura química de los análogos del AO, la DTX-1 y la DTX-2. El OA está constituido por una cadena larga de anillos de poliéter que contiene un grupo carboxilo ácido y tres anillos espirocetales, uno de los cuales une un anillo de 5 miembros con uno de 6 miembros y que difieren en el número o la posición de los grupos de metilo (Farabegoli et al., 2018; Suzuki & Quilliam, 2011).

Las toxinas pertenecientes a este grupo tienen la capacidad de inhibir las fosfatasa de proteínas, así como la motilidad intestinal y la secreción de electrolitos, pudiendo causar falta de control de la secreción de sodio y la permeabilidad celular provocando inflamación del tracto intestinal (Suzuki & Quilliam, 2011). Se caracteriza por provocar intoxicación diarreica causando inflamación del tracto intestinal y diarrea en los seres humanos, ya que inhiben la fosfatasa. En las intoxicaciones agudas presenta síntomas de diarrea, náuseas, vómitos y dolor abdominal (FAO, 2005).

Los primeros casos registrados de DSP en Japón datan de los años 1976 y 1977. Posteriormente aparecen en Europa: España (en 1978), Francia (década de los 80), Suecia (en 1984) y Portugal (en el 2000) (Tong et al., 2018).

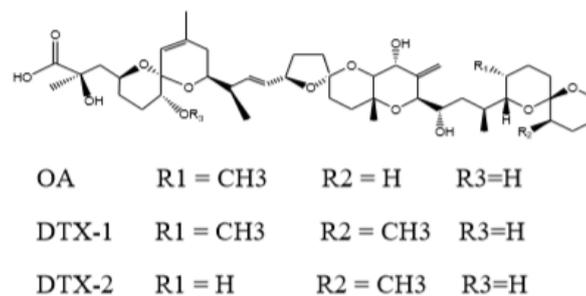


Figura 3. Estructura química de AO y sus análogos

(Imagen extraída de Lugo, 2012)

Grupo de las pectenotoxinas (PTXs)

Las toxinas que forman parte de este grupo pertenecen a una familia de macrólidos que están compuestos por macrolactonas con múltiples anillos poliéteres termoestables, con estructuras que contienen un grupo espirocetal, tres oxalanos, un grupo bicíclico acetal y otro grupo hemiacetal cíclico de seis miembros (Figura 4) (Farabegoli et al., 2018).

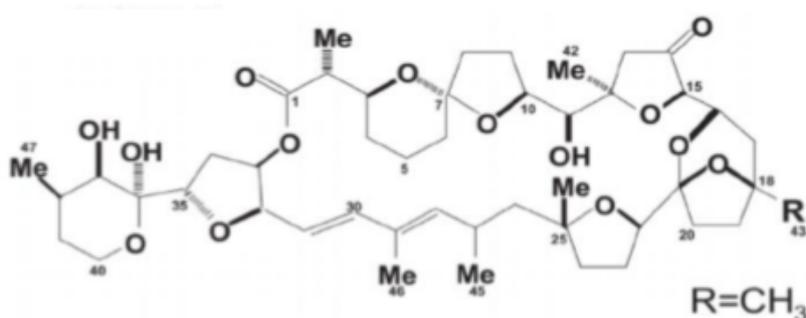


Figura 4. Estructura química de la Pectenotoxina

(Imagen extraída de Lugo, 2012)

Las PTXs tienen la capacidad de provocar alteraciones en el citoesqueleto de la actina de los hepatocitos en los animales y una actividad citotóxica hacia células cancerígenas humanas (Suzuki & Quilliam, 2011).

Antiguamente las PTXs formaban parte del grupo de las DSP, debido a que poseen características típicas del OA, sin embargo algunos estudios posteriores observaron que posee mucha menos toxicidad por vía oral y que no causa diarrea, por lo que se excluyeron del grupo del AO (Suzuki & Quilliam, 2011).

Grupo de los azaspirácidos (AZAs)

El grupo AZA está constituido por toxinas producidas por dinoflagelados tóxicos, los *Azadinium* y *Amphidoma* (Vilariño et al., 2018). Son productores de alto niveles de análogos, azaspirácido-1, azaspirácido-2 y azaspirácido-3, están constituidos por una amina cíclica, tres uniones entre anillos de tipo espiro y un grupo ácido carboxilo, y difieren en la posición de los grupos metilo (Farabegoli et al., 2018). Difieren de los demás grupos de toxinas por tener disposiciones únicas, una amina cíclica en lugar de un grupo imina cíclico, sin anillo carboxílico o de lactona (figura 5) (FAO, 2005).

Su mecanismo de acción en los humanos aún no está claro, aunque los ensayos *in vivo* en ratones e *in vitro* en humanos evidencian que se produce la absorción intestinal de estos compuestos, detectándose en órganos como bazo, riñón, pulmón, corazón, hígado y cerebro (Vilariño et al., 2018). Los cuadros clínicos recuerdan a los de las toxinas diarréicas porque presentan síntomas gastrointestinales como náuseas, vómitos, diarrea y calambres en el estómago (Alfonso Méndez, 2008).

La gravedad de la intoxicación de los análogos está directamente relacionada con las dosis letales; azaspiracida-1 tiene una dosis letal de 200 ug/kg, mientras que los análogos de azaspiracida-2 y 3 son más tóxicos, con dosis letales de 110 ug/kg y 140 ug/kg, respectivamente (Dominguez et al., 2010).

Relatan que los primeros casos de intoxicación por AZAs se produjeron en los Países Bajos en 1995 por mejillones de la especie *Mytilus edulis* (*M.edulis*) y se fue expandiendo a otros países. Actualmente, se han documentado intoxicaciones por AZAs en todo el mundo (Blanco et al., 2017).

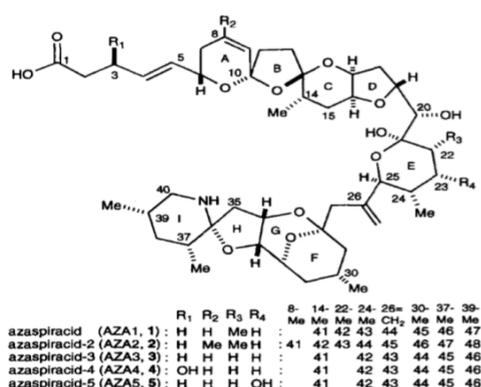


Figura 5. Estructura química de las azaspirácidos y sus análogos

(Imagen extraída de Lugo, 2012)

Grupo de las ciguatoxinas (CTXs)

Las CTXs son producidas por dinoflagelados del género *Gambierdiscus spp.*, que habitan en las aguas cálidas de las regiones tropicales de todo el mundo, pero últimamente estas toxinas han aparecido en las costas europeas (Boente-Juncal et al., 2019).

Este grupo presenta varios análogos, que de acuerdo con su origen pueden ser clasificados como ciguatoxinas del Caribe (C-CTX), ciguatoxinas del Pacífico (P-CTX) y

ciguatoxinas del Índico (I-CTX) (Vilariño et al., 2018). Presentan estructuras poliésteres liposolubles cíclicas, formadas por 13-14 anillos unidos por enlaces éter, pueden mantenerse estables en condiciones ácidas y básicas y son muy resistentes al calor (pueden sobrevivir a la cocción) (FAO, 2005).

Las CTXs tienen la capacidad de activar los canales de Na^+ despolarizando la membrana y causando cambios en los potenciales de acción, alterando el sistema nervioso (neuronas y células musculares) y provocando síntomas neurológicas (Martínez, 2018).

Son responsables de las intoxicaciones tipo ciguatera por pescados, afectando al intestino y causando síntomas gastrointestinales (como náuseas, vómitos, dolor abdominal y diarrea), síntomas cardiovasculares (bradicardia e hipertensión) y complicaciones neurológicas cuando es ingerida por el hombre. Los síntomas ocurren dentro de un periodo desde de unas pocas horas hasta dos semanas después de la exposición (Visciano et al., 2016).

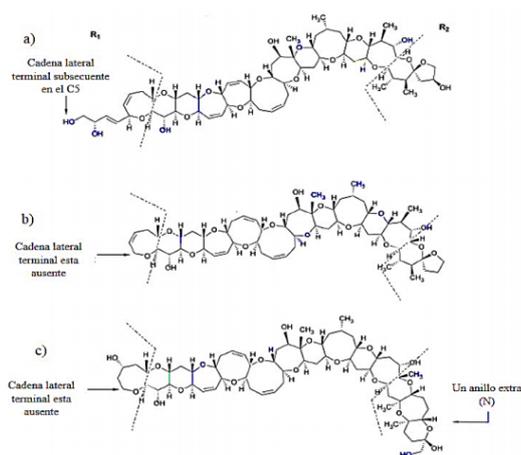


Figura 6. Estructura química de las ciguatoxinas

(Imagen extraída de Martínez, 2018)

Toxinas hidrofílicas

Las toxinas hidrofílicas más importantes son el ácido domoico (DA) y la tetrodotoxina (TTX) (García Mansilla, 2016).

Ácido domoico (DA)

El DA es una neurotoxina producida por algas rojas y especies de diatomeas, como es el caso del *Pseudo-nitzschia*, *C. armata*, *Digenea simplex* y otras especies relacionadas, encontradas en regiones polares, templadas y subtropicales, por lo que entornos costeros de todo el mundo están afectados por estas floraciones tóxicas (Vilariño et al., 2018).

Hay evidencias de que existen diferentes análogos de DA, derivados de epimerización por calentamiento, exposición a la luz ultravioleta y almacenamiento a largo plazo y además son estables al calor, es decir, la toxina no se elimina cuando el organismo que los contiene es cocinado (Farabegoli et al., 2018). La ingestión de moluscos conteniendo esa toxina causa síntomas gastrointestinales (náuseas, vómitos, calambres abdominales y diarrea), cardiovasculares (arritmias y presión arterial inestable) y neurológicos (desorientación, dolor de cabeza, alucinaciones, convulsiones, problemas de memoria y coma) (Radad et al., 2018).

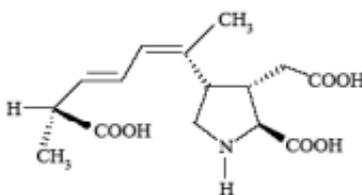


Figura 7. Estructura de DA

(Imagen extraída de Martínez, 2018)

Tetrodotoxina (TTX)

La TTX es una toxina natural que se encuentra en una gran variedad de especies marinas y presenta una alta toxicidad a los humanos. Presenta alta solubilidad en agua y es estable al calor, por lo que en este caso tampoco la cocción elimina su toxicidad (Bane et al., 2014).

El mecanismo de acción actúa bloqueando los canales de Na^+ , evitando la propagación de impulsos en las células musculares y nerviosas (Vlamiš et al., 2015), lo que puede llevar a parálisis muscular, disfunción del nervio craneal e incluso a la muerte debido a la insuficiencia respiratoria (Farabegoli et al., 2018).

Los síntomas de la intoxicación están asociadas a parestesia y entumecimiento oral, parálisis motora temprana, descoordinación, dificultad para hablar, afonía y pupilas fijas/dilatadas, insuficiencia respiratoria grave e hipoxia, hipotensión, bradicardia, arritmias cardíacas y pérdida de la consciencia (Farabegoli et al., 2018; Vilariño et al., 2018).

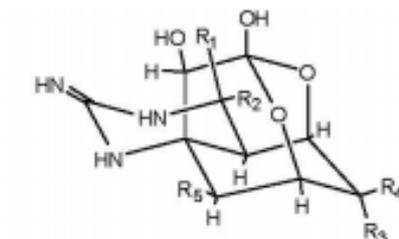


Figura 8. Estructura de la TTX

(Imagen extraída de Martínez, 2018)

3- METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE BIOTOXINAS EN ORGANISMOS MARINOS

Es evidente que es necesario disponer de un conjunto de métodos, que pueden ser métodos biológicos, químicos, inmunológicos, instrumentales y funcionales, que permitan determinar si los productos marinos cumplen con la legislación y son adecuados para el consumo humano (Alfonso Méndez, 2008). Así, se han realizados trabajos a nivel de laboratorio y directamente en campo en donde se han analizado las diferentes biotoxinas presentes en organismos marinos (Lanyun Fang, et al., 2015; Li Fang et al., 2019; Villarroel, 2004).

Debido a que unas toxinas se encuentran en bajas concentraciones, hay métodos que no son viables para su detección, lo que torna una gran preocupación debido a sus efectos adversos a largo plazo sobre el medio ambiente y la salud humana.

Actualmente ya existen legislaciones oficiales sobre los límites detectables de biotoxinas en los alimentos y que establecen normas generales para los técnicos de empresas alimentarias sobre higiene de los productos alimenticios a fin de realizar controles por parte de las autoridades competentes y verificar el cumplimiento de la legislación vigente.

La Unión Europea (UE) establece como cantidades máximas permitidas de algunas biotoxinas marinas, tanto en el cuerpo entero del molusco vivo o en cualquier parte consumible del producto por separado, los siguientes valores: 800 µg PSP/kg, 20 mg DA/kg, 160 µg OAeq (OA, DTXs y PTXs) /kg, 1 mg YTX eq/kg o 160 µg AZAeq/kg (Reglamento (CE) 853/2004 de 29 de abril).

Posteriormente, el Reglamento (CE) 2074/2005 estableció medidas útiles para la aplicación de la legislación anterior, fijando los métodos de análisis biológicos para PSP, métodos cromatográficos para las ASP y los bioensayos de ratón para las toxinas lipofílicas. En el año 2011, la UE estableció para las toxinas lipofílicas el análisis a través de cromatografía líquida de alta resolución con detección de masas en tándem (HPLC-MS) en los controles oficiales de cualquier etapa en la producción de productos derivados del mar y para los autocontroles de los operadores en las empresas de alimentos (EU N.º 15/2011).

Además de tener en cuenta la sustancia a analizar, para la elección de los métodos a utilizar hay que tener en cuenta el objetivo del estudio. Para la cuantificación y diferenciación de toxinas se utilizan los métodos químicos, mientras que para el control y monitoreo de la toxicidad se recurre a métodos de ensayo (Suárez-Gómez, 2003).

Entre los métodos de ensayo más tradicionales se encuentran los bioensayos in vivo con ratones y ratas, los ensayos in vitro de inhibición enzimática, celulares, de receptores, los inmunoensayos y los ensayos electrofisiológicos. Los más utilizados son los modelos animales como las ratas y/o ratones, conocido como Bioensayo de ratón (MBA), que es considerado el método oficial (Visciano et al., 2016).

A continuación, se describen los métodos de análisis más comúnmente empleados para la determinación de biotoxinas en productos de consumo de origen marino.

Bioensayo de ratón

Se basa en obtener extractos de bivalvos contaminados que, seguidamente, se inyectan en ratones estandarizados para ver cómo se comportan, si muere o sobrevive, en un determinado periodo de tiempo (Suárez-Gómez, 2003). Primeramente, se hace la preparación de un extracto lipofílico o hidrofílico de acuerdo con la toxina que se desea detectar, tanto del molusco contaminado o de la muestra de dinoflagelado. Con el medio

apropiado se diluye el extracto y se inyecta intraperitonealmente en ratones con 20 g aproximado. A partir de ahí, se puede observar los síntomas que aparecen con el tiempo (Alfonso Méndez, 2008).

Ese método presenta algunas limitaciones debido a restricciones éticas e insuficiente especificidad y sensibilidad; no es capaz de detectar concentraciones de toxinas en algunos grupos de ellas (OA, AZA y PTX) debajo de sus actuales valores límite reglamentarios de la UE, lo que puede llevar a resultados falso-negativos (Alexander et al., 2009). Sin embargo, es una técnica empleada para los programas de monitorización que garantiza la seguridad alimentaria y protección de la salud de los consumidores.

Para las toxinas del grupo DSP, los métodos de ensayos pueden ser utilizados para inducir la diarrea a los animales alimentándolos con una dieta mezclada con tejido de molusco para ver si aparecen síntomas. Básicamente, se basa en administrar extracto de tejidos de moluscos intragástricamente en ratones recién nacidos, con cuatro o cinco días y con el pasar de cuatro horas se mide el grado de acumulación de fluidos en el trato gastrointestinal y de acuerdo con la cantidad se puede considerar positivo caso este es elevado (Alfonso Méndez, 2008).

Ensayos inmunológicos

Se basan en la detección de reacciones mediante el uso de anticuerpos (G-V, Elizabeth, 2004). Se trata de procesos algo complejos, ya que las toxinas son moléculas pequeñas que no presentan capacidad antigénica lo que se deben unirse a moléculas más grandes antes de ser administradas, además hay que necesitar gran cantidad de toxinas puras para conseguir anticuerpos (Alfonso Méndez, 2008).

La técnica más utilizada son los enzimoimmunoensayos, la ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) que se basa en detectar la reacción de un producto coloreado o fluorescente cuando una toxina se liga a un anticuerpo (Suárez-Gómez, 2003). Es capaz de detectar el DA y sus isómeros en el límite actual establecido por la UE y también en niveles más bajos, por ejemplo, 4,5 mg DA/kg en carne de mariscos (Alexander et al., 2009). Es un método seguro, por su sencillez, sensibilidad, rapidez y capacidad de cuantificación, pero presenta como inconveniente el hecho de que algunos anticuerpos no detectan todas las toxinas del mismo grupo (Alfonso Méndez, 2008).

Ensayos físico-químicos

A su vez, los métodos físico-químicos hacen una separación, identificación y luego una cuantificación individual de las toxinas. Dentro de ellos, se incluyen los métodos químicos basados en la separación cromatográfica de las toxinas (Alfonso Méndez, 2008) y su detección colorimétrica, fluorimétrica o por espectrometría de masas en tándem (MS/MS), así como por electroforesis capilar (Visciano et al., 2016).

Existe un método oficial de la UE (método Lawrence) para analizar las toxinas STX y DA empleando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección por fluorescencia, en el que la toxina STX puede cuantificarse en concentraciones entre 10 y 80 µg de equivalentes STX / kg para análogos individuales (FAO, 2005).

La implementación de técnicas analíticas de alta resolución como HPLC-MS/MS fue de gran importancia para mejorar el conocimiento sobre la producción de biotoxinas, ya que permiten realizar la elucidación estructural de las sustancias, proporcionando una alta especificidad en la detección, además de permitir cuantificarlas a muy bajas concentraciones (Suárez-Gómez, 2003).

Normalmente este tipo de métodos requiere de un paso previo de extracción o preparación de la muestra en la que se pretende determinar las biotoxinas. Por ejemplo, en un estudio llevado a cabo en mariscos de Chile se investigó la presencia de toxina amnésica, STX, neosaxitoxina, gonyautoxinas, AO y dinophysis toxina-1, empleando HPLC después de la aplicación de diferentes procedimientos de extracción dependiendo de la toxina a analizar. Por ejemplo, para la toxina paralizante se realizó una extracción en medio ácido y purificación a través de cartuchos de extracción en fase sólida tipo Sep-pak C18. Para detectar AO y DTXs se empleó una extracción metanólica de la toxina presente en la hepatopáncreas del molusco. Posteriormente, los extractos se analizaron con un detector de diodo-array o de fluorescencia mediante derivatización post columna (Villarroel, 2004).

Ensayos funcionales

Los métodos funcionales se basan en la unión de las toxinas y algún componente que reconoce la estructura de la molécula desencadenando reacciones que ofrecen información acerca de la cantidad de toxina en la muestra (Cañete Ortiz, E, 2012). Para

este método, es de gran importancia conocer el mecanismo de acción de las toxinas. Son conocidos dos grupos de métodos: los ensayos de citotoxicidad con varias líneas celulares que permiten evaluar diferentes efectos tóxicos y los ensayos que utilizan las dianas celulares de las biotoxinas aisladas que permiten evaluar un efecto tóxico concreto (Alfonso Méndez, 2008; Cañete Ortiz, E, 2012). Destacan los ensayos de citotoxicidad que permite la detección y muchas veces la cuantificación de una respuesta toxica de células de cultivo con sospecha de presentar biotoxinas.

En nuestra región de estudio se han llevado a cabo múltiples estudios sobre la detección de biotoxinas marinas, concretamente de ciguatoxinas (Boada et al., 2010; Estevez et al., 2019; Pérez-Arellano et al., 2005). Como se detallará en el siguiente apartado, la bibliografía consultada muestra que la presencia estas toxinas suele ser confirmadas usando el kit de test de ciguatera, mientras que su confirmación estructural se realiza por cromatografía líquida-masa espectrometría (LC-MS/MS). Para la evaluación de toxicidad, generalmente, se emplea el ensayo de citotoxicidad específica del canal de sodio. Sin embargo, Estévez y colaboradores consideran que el ensayo de células de neuroblastoma también es una herramienta útil para la determinación de la toxicidad (Estevez et al., 2019).

4- EVENTOS PRODUCIDOS EN LA MACARONESIA

Las primeras descripciones de eventos de biotoxinas marinas en la Macaronesia, concretamente en Canarias, datan de finales del siglo XVIII (Pérez-Arellano et al., 2005b). Como se describe a continuación, la mayoría de los eventos ocurridos en el área estudiada están referidos a ciguatoxinas.

Los primeros peces contaminados por toxinas (ciguatoxinas) que fueron capturados en las Islas Canarias datan de 2004. A mediados de 2008, se capturaron también en las Islas Salvajes del archipiélago de Madeira, y a finales de 2008 aparecieron nuevamente en peces capturados en las Islas Canarias. A partir de ahí se establecieron límites de captura para ciertas especies de peces (Vale, 2011).

En la Macaronesia, se han registrado un total de 21 brotes de ciguatera, la mayoría en Canarias (18 brotes) y, en menor medida, en Madeira (3 brotes). Todos ellos han sido descritos en la literatura entre 2004 y 2018 (Sistema de Vigilancia Epidemiológica de

Intoxicación por Ciguatoxinas de Canarias) y han afectado a 154 personas, la mayoría de ellas después de consumir medregal, un gran pescado de alimentación carnívora.

A continuación, la Tabla 3 describe las características principales de los brotes de intoxicación por peces con ciguatera en la Macaronesia, donde se incluye información de los brotes referentes al año, mes, archipiélago e isla de ocurrencia, número de casos, pescado asociado, peso del pescado y forma de adquisición.

Las informaciones están organizadas de acuerdo con los archipiélagos que presentan más casos de eventos producidos, empezando por las islas Canarias y siguiendo con Madeira. Hasta la fecha, no existen registros disponibles de eventos ocurridos en Azores y Cabo Verde.

Los datos fueron extraídos por el Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Intoxicación por Ciguatoxinas de Canarias (SVEICC).

El primer brote documentado de intoxicación por ciguatera ocurrió en 2004 en las islas de Tenerife y La Gomera, con un total de 5 personas afectadas, vinculado al pez *Seriola rivoliana* capturado en la costa de dichas islas.

El segundo brote de ciguatera ocurrió en noviembre del 2008 en la isla de Tenerife, donde se registraron 25 personas infectadas por un gran medregal (*Seriola fasciata*) de 37 kg, que fue obtenido de un mercado local.

Tabla 2. Características principales de los brotes de CFP en Macaronesia

Brote	Año	Mes	Región	Isla	Nº de casos	Pescado asociado	Peso del pescado	Forma de adquisición
1	2004	Enero	Canarias	Tenerife y Gomera	5	<i>Seriola rivoliana</i>	26 kg	Pesca recreativa
2	2008	Noviembre	Canarias	Tenerife	25	<i>Seriola fasciata</i>	37 kg	Mercado local
3	2009 2010	Enero	Canarias	Tenerife	4	<i>Seriola dumerilli</i>	67 kg	Pesca recreativa
		Septiembre	Canarias	Gran Canaria	3	<i>Seriola spp</i>	-	Desconocido
4		Noviembre	Canarias	Tenerife	3	<i>Seriola spp</i>	1,5 kg	Pesca recreativa
5		Abril	Canarias	Tenerife	4	<i>Seriola spp</i>	80 kg	
6	2011	Junio	Canarias	Gran Canaria	5	<i>Seriola rivoliana</i>	24 kg	Pesca recreativa
7	2012	Enero	Canarias	Lanzarote	10	<i>Seriola spp</i>	<15 kg	Pesca recreativa

8		Abril	Canarias	Lanzarote	9	<i>Seriola spp</i>	26 kg	Pesca recreativa
9		Mayo	Canarias	Tenerife	4	<i>Seriola spp</i>	-	Mercado local
10		Diciembre	Canarias	Tenerife	12	<i>Epinephelus spp</i>	18 kg	Pesca recreativa
11	2013	Diciembre	Canarias	Lanzarote	16	<i>Epinephelus spp</i>	>29 kg	Pesca recreativa
12	2015	Febrero	Canarias	Tenerife	3	<i>Mycteroperca fusca</i>	3 kg	Pesca recreativa
13		Marzo	Canarias	Lanzarote	2	<i>Pomatomus saltatrix</i>	10 kg	Pesca recreativa
14		Abril	Canarias	Tenerife	3	<i>Mycteroperca fusca</i>	3,5 kg	Pesca recreativa
15	2016	Noviembre	Canarias	Tenerife	2	<i>Epinephelus spp</i>	7 kg	Pesca recreativa
16		Diciembre	Canarias	Tenerife	3	<i>Seriola spp</i>	12 kg	Pesca recreativa
17	2017	Diciembre	Canarias	La Palma	2	<i>Pagrus pagrus</i>	4 kg	Pesca recreativa
18		Abril	Canarias	Gran Canaria	2	<i>Mycteroperca fusca</i> <i>Epinephelus spp</i>	8 kg 29 kg	Pesca recreativa
19	2018	Septiembre	Canarias	Tenerife	4	<i>Canthidermis sufflamen</i>	3,2 kg	Pesca recreativa
1	2007	Agosto	Madeira	Islas Salvajes	6	<i>Seriola sp y otros</i>	-	Pesca recreativa
2	2008	Julio	Madeira	Islas Salvajes	11	<i>Seriola dumerili</i>	30 kg	Pesca recreativa
3	2009	Mayo	Madeira	Islas Salvajes	6	<i>Seriola rivoliana</i>	71 kg	Pesca recreativa

El año siguiente, en 2009, se detectó otro brote también por el consumo de medregal, pero esta vez procedente de pesca recreativa en las islas de Tenerife y Gran Canaria, con 4 individuos afectados.

En 2010 un total de 6 personas se vieron infectadas en la isla de Tenerife, con por un ejemplar de 80 kg de *Seriola sp*.

En el transcurso del año 2011 se registró también un brote en Gran Canaria siendo 5 los afectados tras la ingesta de un medregal de 24 kg.

El pico máximo de intoxicaciones se alcanza en 2012, con un total de 35 personas afectadas en cuatro brotes distintos. Uno de ellos se declaró en Lanzarote como consecuencia de la ingestión de medregal con origen en la pesca deportiva. Otro brote ocurre en Tenerife donde la especie de pescado responsable se repite, pero se desconoce el origen de su captura.

En siguiente brote ocurrió en diciembre de 2013 en la isla de Lanzarote por la ingestión de un mero (*Epinephelus spp*) de más de 29 kg que se encontraba en un puesto de venta en una pescadería de San Bartolomé, siendo afectadas 16 personas.

En 2014 no se registraron registros de ciguatera, pero en el transcurso del año 2015 se citan tres casos, uno en Lanzarote en marzo, con dos afectados y dos en Tenerife con 6 afectados en febrero y abril.

En 2016 produjo otro brote en diciembre en la isla de Tenerife por el consumo de un medregal (*seriola spp*) de 12 kg que intoxicó un total de 5 personas.

En el año 2017 hubo dos brotes, uno en La Palma debido la ingesta de *Pagrus pagrus* y otra en Gran Canaria por *Mycteroperca fusca* y *Epinephelus spp*, ambas afectando a dos personas.

El último brote registrado data de 2018, el cual que se produjo en septiembre en la isla de Tenerife tras la ingesta de un gallo romano (*Canthidermis sufflamen*) de 3,2 kg pescado en modalidad deportiva.

En resumen, en el archipiélago de Canarias se han referenciado 18 brotes con un total de 131 personas afectadas, distribuidas en cinco islas en un corto periodo de tiempo. Entre las especies causantes de la intoxicación aparecen los medregales (*Seriola sp*) con más frecuencia, además de *Mycteroperca fusca*, *Epinephelus spp* y *Canthidermis sufflamen*. No se ha encontrado informaciones sobre los métodos usados para la determinación de ciguatoxinas en Canarias, lo que hace necesario una base de datos donde se registre no solo los brotes sino los métodos empleados para su detección y confirmación.

En el archipiélago de Madeira, el primer brote sospechoso de ciguatera ocurrió en el año 2007, cuando algunos vigilantes del Parque Natural de Madeira y tripulantes de una embarcación de pesca empezaron a tener síntomas gastrointestinales y neurológicas después de la ingestión del pez medregal durante su servicio en las Islas Salvajes. Para

confirmarlo, se realizaron encuestas y se aplicó el kit para test de ciguatera al total de las 6 personas que presentaron síntomas.

Fue también confirmado positivamente que el pescado estaba contaminado por ciguatoxinas en 2008 cuando las 11 personas de la tripulación del barco pesquero Pepe Contreras presentaron los mismos síntomas referidos anteriormente. En este caso se consumieron pez loro (*Sparissoma cretense*), peine de cola negra (*Serranus atricauda*), pez cerdo barrado (*Bodianus scrofa*), pez gatito gris (*Balistes capriscus*) y porgy rojo (*Pagrus pagrus*).

En 2009, también hubo un brote causante por un ejemplar de charuteiro (*Seriola dumerili*) con un peso total de 71 kg capturado en las Islas Salvajes, que fue confirmado como positivo por inmunoensayo realizado con el kit test de ciguatera.



Figura 9. Número de brotes de CFP en Canarias entre 2004 y 2018

De todo lo expuesto, se ha detectado que solo hay reportes de ciguatera en la Macaronesia, principalmente, en las islas Canarias. Eso puede estar relacionado con el calentamiento climático de las aguas superficiales y la intensa actividad antrópica, desde la contaminación, sobrepesca, en costas y mares (Montesdeoca Santana D, 2015).

Para controlar el efecto de estos brotes, hay una necesidad de monitorear otras biotoxinas, entender mejor su comportamiento y sus efectos al hombre y al medio ambiente y los métodos para su detección, para eso hace falta futuros estudios en la Macaronesia.

La mayor incidencia se produce claramente por la pesca recreativa, como vimos en la tabla 2. Se debe a que muchos pescadores recreativos no pasan las capturas por los establecimientos de primera venta de pescado, que es donde se lleva a cabo el análisis. El hecho de que tengan que pagar el análisis y el miedo a incumplir las normativas en cuanto a capturas parece estar detrás de este comportamiento.

5- CONCLUSIONES

Las biotoxinas son un problema de salud pública en todo el mundo debido a sus efectos adversos sobre la salud humana y el medio ambiente. Los problemas causados por las biotoxinas requieren que se profundice en su estudio para minimizar sus efectos. Por tanto, es necesario disponer de metodologías y sistemas de control para la protección del consumidor de productos de origen marino. Además, es de gran importancia saber con exactitud cómo se comportan estas biotoxinas para valorar la elección del método para su detección.

En este Trabajo Fin de Master se ha realizado una revisión bibliográfica de las biotoxinas marinas más importantes y sus efectos, así como de las metodologías analíticas empleadas para la confirmación de su presencia en la Macaronesia. Con el primer caso de ciguatera reportado, se comenzó a estudiar su presencia en las Islas Canarias. La ciguatera es un envenenamiento propio de las zonas tropicales causada por la ingestión de pescado portador de toxinas producidas por dinoflagelados del género *Gambierdiscus toxicus*, y la mayoría de los casos reportados en la Macaronesia se han dado en las Islas Canarias. Las metodologías más utilizadas para su determinación fueron los kits test de ciguatera y la LC-MS/MS, considerándose los métodos más fiables. Todavía se hace necesario una base de datos donde se registre los métodos empleados para la determinación de ciguatoxinas.

No se han encontrado datos de eventos de biotoxinas en los archipiélagos de Azores y Cabo Verde. Una de las razones de esta falta de información puede estar relacionada con la necesidad de implementación de instrumentos como la LC-MS/MS y la falta de

disponibilidad comercial de materiales de referencia, así como personal con experiencia en el área. Por tanto, existe la necesidad de seguir trabajando en la identificación de eventos de biotoxinas en Cabo Verde y Azores.

Además, para la minimización de los brotes provocadas por las biotoxinas marinas en la Macaronesia es de gran importancia que las administraciones adopten las medidas que sean pertinentes para un control más rígido de los casos, además de campañas educativas e informativas para la prevención de los riesgos, principalmente dirigidas a los pescadores recreativos, con la intención de evitar riesgos futuros derivados del consumo de productos de origen marino.

6- BIBLIOGRAFÍA

Alexander, J., Benford, D., Boobis, A., Ceccatelli, S., Cravedi, J., Di, A., ... Mutti, A. (2009). Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain, Marine biotoxins in shellfish – Summary on regulated marine biotoxins. *EFSA Journal*, 1306, 1–23. https://www.researchgate.net/publication/242512725_SCIENTIFIC_OPINION_Marine_biotoxins_in_shellfish__Pectenotoxin_group_1_Scientific_Opinion_of_the_Panel_on_Contaminants_in_the_Food_chain. Recuperado el 01/09/2020.

Alfonso Méndez, M. del C. (2008). Desarrollo de métodos para el aislamiento y la detección de toxinas marinas en productos de la pesca y la acuicultura. Tesis doctoral. Minerva. *Repositorio Institucional Da Usc*, 72(5), 1–130. <https://minerva.usc.es/xmlui/handle/10347/2545>. Recuperado el 02/09/2020.

Bane, V., Lehane, M., Dikshit, M., O’Riordan, A., & Furey, A. (2014). Tetrodotoxin: Chemistry, toxicity, source, distribution and detection. *Toxins*, 6(2), 693–755. doi: <https://doi.org/10.3390/toxins6020693>

Blanco, J., Mariño, C., Martín, H. & Acosta, C.P. (2007). Anatomical distribution of 665 diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon*, 50 (8), 1011–1018. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.09.002>

Boada, L. D., Zumbado, M., Luzardo, O. P., Almeida-González, M., Plakas, S. M., Granade, H. R., ... Dickey, R. W. (2010). Ciguatera fish poisoning on the West Africa Coast: An emerging risk in the Canary Islands (Spain). *Toxicon*, 56(8), 1516–1519.

Boente-Juncal, A., Álvarez, M., Antelo, Á., Rodríguez, I., Calabro, K., Vale, C., ... Botana, L. M. (2019). Structure elucidation and biological evaluation of maitotoxin-3, a homologue of gambierone, from *gambierdiscus belizeanus*. *Toxins*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/toxins11020079>

Botana, L., Vilari, N., & Botana, P. L. (2018). A vision on marine toxins in 2050 from climate change, biosecurity and food security. *Instituto Español de Estudios Estratégicos (IEEE)*732–749.

http://www.ieee.es/en/Galerias/fichero/docs_investig/2018/DIEEEINV06-2018_ToxinasMarinas_Horizonte2050_LBotana.pdf. Recuperado: 28/08/2020.

Cañete Ortiz, E. (2012). Optimización de ensayos celulares para la detección de toxinas marinas responsables de intoxicaciones alimentarias. Aplicación en extractos lipofílicos de muestras naturales de *Mytilus galloprovincialis*. Universidad de Barcelona. https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/83569/03.CA%C3%91ETE_3de12.pdf?sequence=3&isAllowed=y. Recuperado el 28/08/2020.

Dominguez, H. J., Paz, B., Daranas, A. H., Norte, M., Franco, J. M., & Fernández, J. J. (2010). Dinoflagellate polyether within the yessotoxin, pectenotoxin and okadaic acid toxin groups: Characterization, analysis and human health implications. *Toxicon*, 56(2), 191–217. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.11.005>

Guzmán-Vázquez, E. (2004). V. Las pruebas de Elisa. *Gac Méd Méx Vol. 140, Suplemento No. 3*. <https://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2004/gms043o.pdf>. Recuperado el 28/08/2020).

Estevez, P., Castro, D., Pequeño-Valtierra, A., Leao, J. M., Vilariño, O., Diogène, J., & Gago-Martínez, A. (2019). An attempt to characterize the ciguatoxin profile in *seriola fasciata* causing ciguatera fish poisoning in macaronesia. *Toxins*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/toxins11040221>

Fang, Lanyun, Yao, X., Wang, L., & Li, J. (2015). Solid-phase extraction-based ultra-sensitive detection of four lipophilic marine biotoxins in bivalves by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatographic Science*, 53(2), 373–379. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmu054>

Fang, Li, Qiu, F., & Yu, X. (2019). Determination of Lipophilic Marine Biotoxins in Shellfish by Online Turbulent Flow Chromatography Coupled to Liquid

Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Chromatographia*, 82(9), 1321–1331. <https://doi.org/10.1007/s10337-019-03705-0>

FAO. (2005). Seafood toxins: Poisoning by bivalve consumption. *Food Science and Technology International*, 2(1), 13–22. <https://doi.org/10.1177/108201329600200102>. Recuperado el 17/06/2020.

FAO. (2011). Assessment and management of biotoxin risk in bivalve molluscs. Fisheries and Aquaculture Technical Paper. ISBN 978-92-5-107003-1. <http://www.fao.org/3/i2356e/i2356e.pdf>. Recuperado el 28/06/2020).

Farabegoli, F., Blanco, L., Rodríguez, L. P., Manuel Vieites, J., & García Cabado, A. (2018). Phycotoxins in marine shellfish: Origin, occurrence and effects on humans. *Marine Drugs*, 16(6). <https://doi.org/10.3390/md16060188>

García Mansilla, C. E. (2016). Distribución, metabolismo y composición de las toxinas lipofílicas en especies de bivalvos y gasterópodos endémicos del sur austral de Chile. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=78116>. Recuperado el 03/09/2020.

Hess, P. (2010). Requirements for screening and confirmatory methods for the detection and quantification of marine biotoxins in end-product and official control. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(5), 1683–1694. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3444-y>

Lugo, M. P. O. F. (2012). Desarrollo de técnicas de identificación, detección y purificación de toxinas lipofílicas. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. <http://hdl.handle.net/10347/8161>. Recuperado el 05/09/2020.

Martínez, T.-C. L. (2018). Identificación y cuantificación de Ciguatoxinas en peces carnívoros de la Península de Yucatán. Tesis de Maestro. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/1379/1/ley_t%20TESIS.pdf. Recuperado el 07/09/2020.

Montesdeoca Santana, D. (2015). La ciguatera en Canarias. Tesis de grado. Universidad La Laguna. http://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/1260/La_ciguatera_en_Canarias.pdf?sequence=1. Recuperado el 29/08/2020.

Morabito, S., Silvestro, S., & Faggio, C. (2018). How the marine biotoxins affect human

health. Natural Product Research, 32(6), 621–631.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1329734>

Mózo, B. S. (2017). Intoxicacion por Dinflagelados. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Pérez-Arellano, J. L., Luzardo, O. P., Brito, A. P., Cabrera, M. H., Zumbado, M., Carranza, C., ... Boada, L. D. (2005a). Ciguatera fish poisoning, Canary Islands. *Emerging Infectious Diseases*, 11(12), 1981–1982.
<https://doi.org/10.3201/eid1112.050393>

Pérez-Arellano, J. L., Luzardo, O. P., Brito, A. P., Cabrera, M. H., Zumbado, M., Carranza, C., ... Boada, L. D. (2005b). Ciguatera fish poisoning, Canary Islands [8]. *Emerging Infectious Diseases*, 11(12), 1981–1982.
<https://doi.org/10.3201/eid1112.050393>

Radad, K., Moldzio, R., Al-Shraim, M., Al-Emam, A., & Rausch, W. D. (2018). Long-term neurotoxic effects of domoic acid on primary dopaminergic neurons. *Toxicology in Vitro*, 52(March), 279–285. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.07.004>

Reglamento (UE) N.º 15/2011 de la Comisión de 10 de enero de 2011 por el que se modifica el Reglamento (CE) no 2074/2005 en lo relativo a los métodos de análisis reconocidos para la detección de biotoxinas marinas en moluscos bivalvos vivos. *Diario Oficial de la Unión Europea*. 2011, L6, 36.

Reglamento (CE) N.º 2074/2005 de la Comisión en lo que respecta a los controles oficiales. *Diario Oficial de la Unión Europea*. 2019, L131, 51-100.

Reglamento (CE) N.º 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. *Diario Oficial de la Unión Europea*. 2004, L139, 55

Rodríguez, I., Alfonso, A., González-Jartín, J. M., Vieytes, M. R., & Botana, L. M. (2018). A single run UPLC-MS/MS method for detection of all EU-regulated marine toxins. *Talanta*, 189, 622–628. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.07.050>

Roman, R; Acebey, L. (2011). Intoxicación por productos del mar. *Universidad de ciencias médicas*.
https://www.researchgate.net/publication/236963933_INTOXICACION_POR_PRODU

CTOS_DEL_MAR. Recuperado el 02/09/2020.

Servicio de Epidemiología. Brotes Autóctonos de Ciguatera 2008-2015 <https://www3.gobiernodecanarias.org/sanidad/scs/content/f5edb564-6fde-11e9-800c-bbb933db73e3/Cuadrobrotos2008-2018.pdf>. Recuperado el 18/06/2020).

Soliño, L. (2015). Detección de toxinas marinas y caracterización de su mecanismo de acción mediante ensayos celulares. Aplicaciones a la identificación de riesgos alimentarios. Tesis doctoral. 172. <https://www.tdx.cat/handle/10803/378655>. Recuperado em 06/09/2020.

Suárez-Gómez, B. R. (2003). Estudio sobre toxinas marinas de naturaleza polietérea . Aislamiento , elucidación estructural y evaluación de su potencial farmacológico. Ciencias y tecnologías/5 I.S.B.N.: 84-7756-592-9. (<https://riull.ull.es/xmlui/handle/915/10479>. Recuperado el 25/08/2020.

Suárez, B., & Guzmán, L. (2005). Floraciones de algas nocivas: Mareas rojas y toxinas marinas. Editorial Universitaria. Santiago de Chile, 1–56. (https://www.ifop.cl/marearaja/wp-content/uploads/sites/2/2016/01/8_-FLORACIONES-DE-ALGAS-NOCIVAS-Mareas-Rojas-y-Toxinas-Marinas-Guzman-y-Suarez-1998.pdf. Recuperado el 18/06/2020.

Suzuki, T., & Quilliam, M. A. (2011). LC-MS/MS analysis of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins, okadaic acid and dinophysistoxin analogues, and other lipophilic toxins. *Analytical Sciences*, 27(6), 571–584. <https://doi.org/10.2116/analsci.27.571>

Tong, T. T. V., Le, T. H. H., Tu, B. M., & Le, D. C. (2018). Spatial and seasonal variation of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins in bivalve mollusks from some coastal regions of Vietnam and assessment of potential health risks. *Marine Pollution Bulletin*, 133(February), 911–919. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.06.045>

Vale, P. (2011). Biotoxinas emergentes em águas europeias e novos riscos para a saúde pública. *Revista Portuguesa de Saude Publica*, 29(1), 77–87. [https://doi.org/10.1016/S0870-9025\(11\)70010-4](https://doi.org/10.1016/S0870-9025(11)70010-4)

Vilariño, N., Louzao, M. C., Abal, P., Cagide, E., Carrera, C., Vieytes, M. R., & Botana, L. M. (2018). Human poisoning from marine toxins: Unknowns for optimal consumer protection. *Toxins*, 10(8), 1–38. <https://doi.org/10.3390/toxins10080324>

Villarroel G, O. (2004). Detección de toxinas paralizante, diarreica y amnésica en mariscos de la XI región por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y bioensayo en ratones. *Revista Ciencia y Tecnología del Mar*, Vol. 27 (2)

Visciano, P., Schirone, M., Berti, M., Milandri, A., Tofalo, R., & Suzzi, G. (2016). Marine Biotoxins: Occurrence, Toxicity, Regulatory Limits and Reference Methods. *Frontiers in Microbiology*, 7(July), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01051>

Vlami, A., Katikou, P., Rodriguez, I., Rey, V., Alfonso, A., Papazachariou, A., ... Botana, L. M. (2015). First detection of tetrodotoxin in greek shellfish by UPLC-MS/MS potentially linked to the presence of the dinoflagellate *prorocentrum minimum*. *Toxins*, 7(5), 1779–1807. <https://doi.org/10.3390/toxins7051779>

- **Descripcion detallada de las actividades desarrolladas durante la realizacion del TFT**

Durante el desarrollo del TFM, primeiramente hice una pesquisa bibliografica acerca del tema para tener informaciones y saber como organizarlas de forma adecuada.

- **Formacion recibida (cursos, programas informaticos, etc.)**

No recebi ninguna formacion durante este tiempo, mas tuve la oportunidad de receber informaciones, conhecimientos, por parte de mis tutoras. Tuvemos una buena relacion, siempre estuvieron presentes para criticas, sugerencias.

- **Nivel de integracion e implicacion dentro del departamento y relaciones con el personal**

El trabajo fue realizado telematicamente, pero hube un alto nivel de integracion con los tutores.

- **Aspectos positivos y negativos más significativos relacionados con el desarrollo del TFT**

El trabajo fue realizado telematicamente, debido a la pandemia, y por eso no fue possivel hacer un trabajo pratico laboratorial, lo que considero un punto negativo, ja que me gustaria mucho hacer un trabajo laboratorial.

- **Valoracion personal del aprendizaje conseguido a lo largo del TFT**

A lo largo del TFT Pero tuve la oportunidad de enriquecer mis conocimientos sobre las biotoxinas y con eso me despertó un gran interese en estudiar las biotoxinas marinas, principalmente em Cabo verde, ja que no hay estudios relacionados con eso. Asi que futuramente pretendo seguir esa linha de pesquisa cientifica de las biotoxinas marinas, y con eso dar mi contributo para el controle de los mismos.